植物角质降解菌的种属鉴定、发酵条件优化及酶学性质研究

梁争文[1]　张铁鹰[1*]　李　爽[1]　刘俊丽[2]

（1.中国农业科学院北京畜牧兽医研究所，动物营养学国家重点实验室，北京 100193；2.甘肃农业大学动物科学技术学院，兰州 730070）

摘　要：本试验旨在通过角质降解菌株 X8P 的种属鉴定、发酵条件优化和酶学性质研究，探讨降解植物表面角质层，进一步改善动物对植物纤维利用的可能新方案。试验通过形态观察和 16S rDNA 测序鉴定菌株 X8P 种属，并对其产酶所需碳源、氮源、发酵温度与时间进行优化，其发酵液经硫酸铵盐析沉淀获得其胞外蛋白粗酶，并对其粗酶催化的适宜 pH 和 pH 稳定性、温度和温度稳定性，以及有机溶剂、表面活性剂和金属离子对其活性的影响进行研究。结果表明：1）菌株 X8P 经形态观察和分子鉴定为东方醋杆菌（*Acetobacter orientalis*）。2）菌株 X8P 适宜产酶发酵条件为溶菌肉汤（LB）培养基中 37 ℃发酵 4 d，1%橄榄油和 1%葡萄糖明显促进菌株产酶，而 1%可溶性淀粉明显抑制菌株产酶。3）该菌株胞外粗酶催化适宜 pH 和温度分别为 6.5 和 45 ℃，且表现出一定 pH 稳定性，但在有机溶剂中不稳定，仅甘油中可保留全部活性，在二甲基亚砜（50%）中活性可保留 66%。吐温（Tween）-20（1 mmol/L）、Tween-80（1 mmol/L）和聚乙二醇辛基苯基醚（1 和 10 mmol/L）可使菌株 X8P 粗酶活性提高 3%~35%。金属离子钾离子(K^+)、锰离子（Mn^{2+}）（1 和 10 mmol/L）可使菌株 X8P 粗酶活性提高 2%~20%。由此可见，菌株 X8P 具有一定的产角质酶潜力和应用前景，可进一步深入研究。

关键词：角质；角质酶；角质降解菌；发酵条件优化；酶学性质

中图分类号：S811.6　　　　　文献标识码：　　　　　　　文章编号：

植物叶片和籽实表面均覆盖有角质层，厚度约为 0.1 μm[1-2]。角质层主要组成成分为角质，此外还含有约 0.6%蜡质、0.9%果胶、1.3%蛋白质、2.0%非纤维多糖、灰尘及杂质等组

收稿日期：2016-05-01
作者简介：梁争文（1991—），男，河南洛阳人，硕士研究生，动物营养与饲料科学专业。E-mail：13126664873@163.com
*通信作者：张铁鹰，副研究员，硕士生导师，E-mail： zhty999@163.com

分[3]。角质层化学性质稳定，且耐酸碱、耐氧化，这可能使反刍动物瘤胃中和猪、兔等单胃动物后肠微中生物及其酶与饲料原料纤维的有效接触减少，也可能使黏附在植物纤维颗粒上的微生物数量减少，从而影响动物消化道对植物纤维材料的降解[4]。近年来，食品加工副产品如酒糟、麸皮、玉米皮等越来越多用于猪、禽饲粮中。这些原料富含角质，可能是限制动物尤其是单胃动物后肠微生物对纤维降解的主要障碍之一。破坏植物角质层，会使其渗透性增加，机械强度降低[5]。

角质降解菌产生的角质酶可水解角质层屏障，利于其侵染植物。经角质酶处理的植物性饲料亦同样利于动物消化道内微生物及酶快速与植物内部组织结合，增加表面微生物及酶的活性，提高纤维降解速率。因此，采用生物技术手段破坏植物角质层可能是提高饲料植物纤维消化利用的关键之一。目前，人们对真菌角质酶的研究最为广泛，来自镰刀菌属（*Fusarium*）、炭疽菌属（*Colletotrichum*）、链核盘菌属（*Monilinia*）等 14 属 20 多种真菌的角质酶已得到深入研究[6]。其中茄病镰孢菌（*Fusarium solani pisi*）角质酶研究最为透彻，且其三维结构已解析[7]。相反，人们对细菌和放线菌角质酶了解较少[8]，且对细菌来源角质酶编码基因信息了解也十分有限[4]。目前仅对假单胞菌（*Pseudomonas*）和嗜热裂胞菌（*Thermobifida*）来源的角质酶进行了纯化和生化特征分析，并获得其角质酶编码信息[9]。因此，本研究拟通过对角质降解菌 X8P 种属鉴定、发酵条件优化和酶学性质研究，以探讨其所产酶特点及在畜牧业中应用潜质。

1　材料与方法

1.1　试验材料

1.1.1　菌株来源

菌株 X8P 为本实验室分离保存。

1.1.2　培养基

溶菌肉汤（LB）培养基：酵母提取物 5 g，胰蛋白胨 10 g，氯化钠 10 g，去离子水 1 000

mL，自然 pH，121 ℃灭菌 20 min。

发酵培养基：橄榄油 10 g，硫酸铵 5 g，牛肉膏 5 g，酵母粉 5 g，蛋白胨 10 g，氯化钠 10 g，去离子水 1 000 mL，自然 pH，121 ℃灭菌 20 min。

1.1.3 试剂

α-乙酸萘酯（α-naphthyl acetate）、2-(N-吗啡啉)乙磺酸[2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid,MES]，购自 Sigma 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株鉴定

形态特征：将菌株 X8P 划线于 LB 平板培养基上培养，观察单菌落形态。

16S rDNA 序列测定和系统发育分析：提取菌株基因组 DNA，采用 16S rDNA 扩增通用引物（27 F：5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′，1492 R：5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′），扩增菌株 16S rDNA。PCR 纯化产物测序由博迈德科技发展有限公司完成。将测序结果在 NCBI 上用 BLAST 程序与 GenBank 中 16S rDNA 序列进行同源性分析，用 MEGA5.2 中的邻接（neighbor-joining）法构建系统发育树。

1.2.2 菌株发酵条件优化

1.2.2.1 制种

将甘油保存的菌株 X8P 在 LB 培养基上划线活化后，从平板上挑取单菌落到种子培养基中，振荡培养制备种子液。

1.2.2.2 碳源对菌株产酶的影响

以 LB 培养基为对照，分别研究 1%橄榄油、碱处理角质、角质、麸皮、玉米芯、秸秆、蔗糖、葡萄糖和可溶性淀粉等碳源对菌株 X8P 胞外酶活性影响。在 30 ℃、150 r/min 下，发酵培养 4 d，获得粗酶液。

1.2.2.3 氮源对菌株产酶的影响

在 LB 培养基和最佳碳源基础上，分别研究 0.5%胰蛋白胨、酵母粉、牛肉膏、酪蛋白、氯化铵和硫酸铵等氮源对菌株 X8P 胞外酶活性影响。在 30 ℃、150 r/min 下，发酵培养 4 d，获得粗酶液。

1.2.2.4　发酵温度对菌株产酶的影响

在 LB 培养基添加最佳碳源和最佳氮源基础上，分别研究不同发酵温度（25、30、37、40 和 45 ℃）对菌株 X8P 胞外酶活性的影响。150 r/min 发酵培养 4 d，获得粗酶液。

1.2.2.5　发酵时间对菌株产酶的影响

在单一因素优化基础上，研究发酵时间（1、2、3、4、5 和 6 d）对菌株 X8P 胞外酶活性影响。在 37 ℃、150 r/min 下培养获得粗酶液。

上述发酵条件优化每个处理均为 3 个重复。

1.2.3　菌株 X8P 胞外酯酶酶学性质

1.2.3.1　菌株 X8P 胞外粗酶液制备及粗纯化

将菌株 X8P 发酵粗酶液经超滤浓缩、硫酸铵沉淀和透析除盐，获得该菌株角质酶粗酶。

1.2.3.2　菌株 X8P 胞外粗酶适宜 pH 和 pH 稳定性

适宜 pH 测定：在不同 pH（pH 2.5～9.5，每隔 0.5 设 1 个测试点）测定菌株粗酶活性，反应温度 50 ℃。

pH 稳定性测定：将菌株 X8P 粗酶液按 1:9 的比例与不同 pH（pH 2.5～9.5，每隔 0.5 设 1 个测试点）缓冲液稀释混匀，将稀释粗酶液于 50 ℃水浴处理 30 min 后，迅速冰水冷却（30 min），测定稀释液酶活性。

1.2.3.3　菌株 X8P 胞外粗酶适宜温度和温度稳定性

适宜温度测定：将菌株 X8P 粗酶液适当稀释于 50 mmol/L、pH 6.5 MES 缓冲液后，分别在 30～80 ℃（每隔 5 ℃为 1 个测试点）下测定酶活性。

温度稳定性测定：将菌株 X8P 粗酶液分别在不同温度（0～80 ℃，每隔 10 ℃为 1 个测

试点）处理 30 min，缓冲液为 50 mmol/L、pH 6.5 MES 缓冲液，冰水浴 30 min，测定残余酶活性。

1.2.3.4　有机试剂对菌株 X8P 胞外粗酶活性影响

将甲醇、乙醇、甘油、异丙醇、丙酮、二甲基亚砜、乙腈等有机试剂分别以 50%(*v*/*v*)和 80%(*v*/*v*)终浓度与菌株 X8P 粗酶液在 30 ℃保温 60 min 后，迅速冰水浴 30 min，测定残余酶活性。以未加有机试剂的对照酶活性为 100%。

1.2.3.5　表面活性剂和金属离子对菌株 X8P 胞外粗酶活性影响

表面活性剂影响：将吐温（Tween）-20、Tween-80、十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfate，SDS）、聚乙二醇辛基苯基醚（Triton-100）等表面活性剂（1 和 10 mmol/L）和菌株 X8P 粗酶液在 30 ℃保温 60 min 后，迅速冰水浴 30 min，测定残余酶活性，以未加表面活性剂对照酶活性为 100%。

金属离子影响：将溶于 50 mmol/L、pH 6.5 MES 缓冲液的 1 和 10 mmol/L 金属离子[钠离子（Na^{+}）、镁离子（Mg^{2+}）、锰离子（Mn^{2+}）、钙离子（Ca^{2+}）、钡离子（Ba^{2+}）、二价铁离子（Fe^{2+}）、锌离子（Zn^{2+}）、铜离子（Cu^{2+}）、钾离子（K^{+}）、镍离子（Ni^{2+}）、三价铁离子（Fe^{3+}）]与菌株粗酶液在 30 ℃保温 60 min，冰水浴 30 min，测定残余酶活性。以未加金属离子对照酶活性为 100%。

上述酶学性质试验结果取 3 次平均值。

1.2.4　酯酶活性测定方法

酯酶活性测定参照刘春红等[10]方法，并进行少许改进：移取 50 μL 酶液，加入 pH 6.5 缓冲液 800 μL，然后加入 50 μL α-乙酸萘酯溶液，50 ℃恒温水浴反应 10 min，加入 50 μL 3%SDS 水溶液终止反应，再加入 50 μL 0.03%固兰 B 盐溶液显色，混匀计时 30 s 后，再加入 50 μL 1∶1(*v*/*v*)盐酸溶液混匀使其显色稳定，将酶液换为蒸馏水作为空白对照，检测并记录 535 nm 吸光度数据，酶活性（U）定义为在以上条件下，每分钟反应生成 1.0 μmol/L α-

乙酸萘酚所需要酶量。

1.3 数据统计与分析

试验验数据使用 Excel 2007 统计软件进行初步整理和统计，并用绘图软件 Graphpad Prism 5 绘制折线图和柱状图。

2 结 果

2.1 菌株鉴定

菌株 X8P 单菌落形态：圆形点状凸起，颜色微黄，黏稠，边缘平滑，有光泽，不透明，表面光滑无褶皱。菌株 16S rDNA Blast 结果显示菌株 X8P 与东方醋杆菌（*Acetobacter orientalis*）21F-2 同源性可达 99%，通过菌株菌落形态特征、遗传距离初步判定并命名为 *Acetobacter orientalis* X8P。

菌株 X8P 16S rDNA 序列测序结果如下：

GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTCGATCCGC

GATTACTAGCGATTCCACCTTCATGTACTCGAGTTGCAGAGTACAATCCGAACTGAGAC

GGTTTTTAGAGATCAGCACGATGTCGCCATCTAGCTTCCCACTGTCACCGCCATTGTAG

CACGTGTGTAGCCCAGGACATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCT

CCGGCTTGTCACCGGCAGTCTCTCTAGAGTGCCCACCCAAACATGCTGGCAACTAAAG

ATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC

AGCCATGCAGCACCTGTGCGGTAGGTCCCTTGCGGGAAATGCCCATCTCTGGACACAG

CCTACCCATACAAGCCCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTC

CACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGCCGTACTCCC

CAGGCGGTGTGCTTAACGCGTTAACTGCGACACTGAATAACTAAGTTACCCAACATCTA

GCACACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCT

TTCGCGCCTCAGCGTCAGTTATGAGCCAGGTTGCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTTCCC

AATATCTACGAATTTCACCTCTACACTGGGAATTCCACAACCCTCTCTCACACTCTAGTC

TGCACGTATCAAATGCAGCTCCCAGGTTAAGCCCGGGGATTTCACATCTGACTGTACAA

ACCGCCTACACGCCCTTTACGCCCAGTCATTCCGAGCAACGCTAGCCCCCTTCGTATTA

CCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTACGGGTACCGTCATCATCGTC

CCCGTCGAAAGTGCTTTACAATCCGAAAACCTTCTTCACACACGCGGCATTGCTGGAT

CAGGGTTGCCCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCG

TGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTATTGATCATCGCCTTGGT

AGGCCATTACCCCACCAACAAGCTAATCAAACGCAGGCTCCTCCACAGGCGACTTGCG

CCTTTGACCCTCAGGTATCATGCGGTATTAGCTCCAGTTTCCCAGAGTT。

菌株 X8P 系统发育树见图 1。

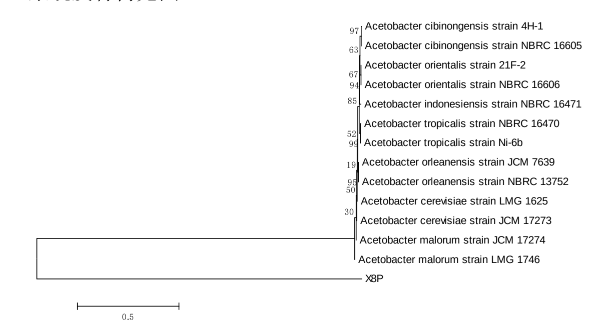


图 1　菌株 X8P 系统发育树

Fig.1　The phylogenetic tree of strain X8P

2.2　菌株 X8P 产酯酶发酵条件优化

2.2.1　碳源对菌株 X8P 产酯酶的影响

由图 2 可知，1%橄榄油、碱处理角质、角质、葡萄糖和蔗糖促进菌株 X8P 产酶，橄榄油促进作用最明显，使活性提高 11 倍左右。1%玉米芯、麸皮和秸秆对菌株 X8P 产酶影响不大，而 1%可溶性淀粉对菌株 X8P 产酶有明显抑制作用。菌株 X8P 以橄榄油为适宜碳源。

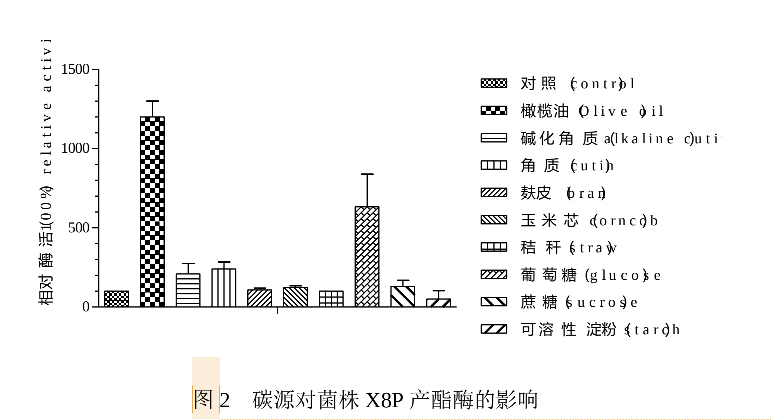


图 2　碳源对菌株 X8P 产酯酶的影响

批注 [W1]: 排版时去除括号　英文首字母大写　图 3 图 8 同

Fig.2　Effects of carbon source on esterase producing of strain X8P

2.2.2　氮源对菌株 X8P 产酯酶的影响

由图 3 可知，在 LB 培养基和适宜碳源基础上，再添加无机氮和有机氮均明显抑制菌株 X8P 产酶。

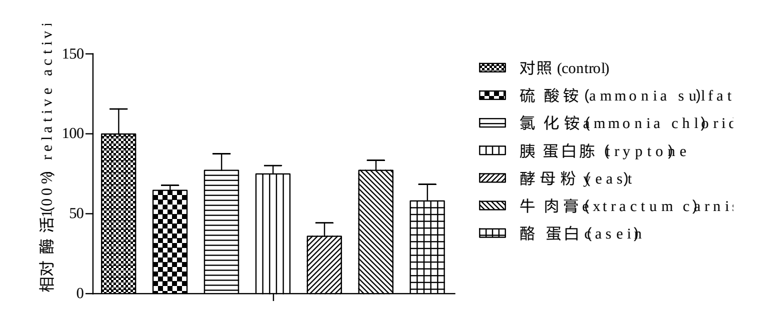


图 3　氮源对菌株 X8P 产酯酶的影响

Fig.3　Effects of nitrogen source on esterase producing of strain X8P

2.2.3　发酵温度对菌株 X8P 产酯酶的影响

由图 4 可知，菌株 X8P 在 37 ℃发酵产酶量最大，室温不利于产酶，超过适宜温度后，产酶量急剧下降。

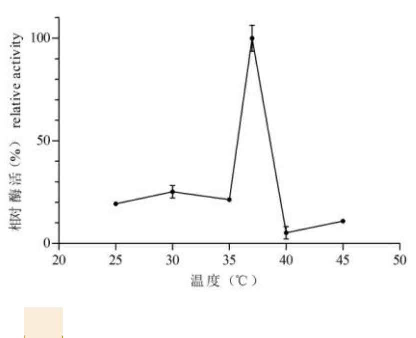


图 4　发酵温度对菌株 X8P 产酯酶的影响

Fig.4　Effects of fermentation temperature on esterase producing of strain X8P

批注 [W2]: 横坐标　温度　Temperature/℃
纵坐标　相对活性　Relative activity/%

2.2.4　发酵时间对菌株 X8P 产酯酶的影响

由图 5 可知，菌株 X8P 在第 1～2 天发酵产酶量较少，自第 3 天开始产酶量急剧增加，至第 4 天时达到最高，此后酶活性呈下降趋势。因此，菌株 X8P 适宜发酵时间为 4 d。

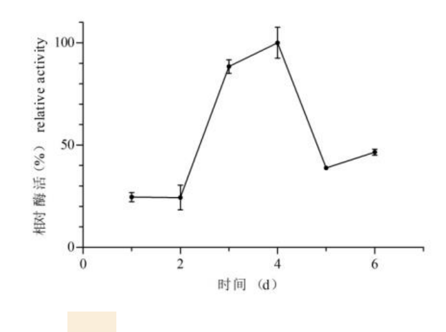


图 5　发酵时间对菌株 X8P 产酯酶的影响

Fig.5　Effects of fermentation time on esterase producing of strain X8P

批注 [W3]: 横坐标　时间　Time/d
纵坐标　相对活性　Relative activity/%

2.3　菌株 X8P 胞外酯酶粗酶酶学性质

2.3.1　菌株 X8P 胞外酯酶粗酶适宜 pH 和 pH 稳定性

由图 6 可知，菌株胞外粗酶适宜 pH 6.5，在 pH 4.0 以下，酶活性几乎全部丧失。在碱性环境时，酶活性急剧丧失。具有一定的 pH 稳定性，在 pH 6.5～7.5 内 30 min，活性可保留 60%以上。

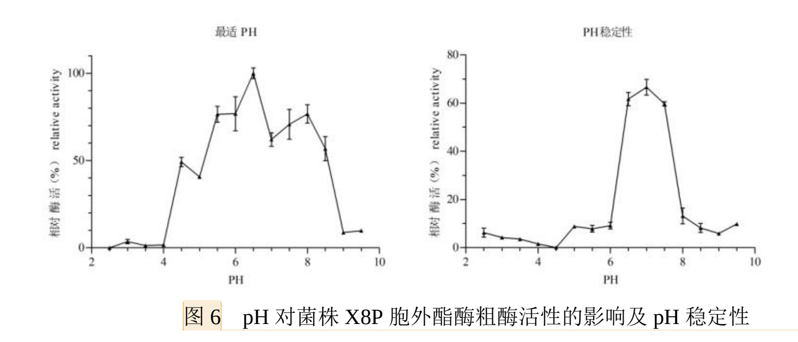


图 6　pH 对菌株 X8P 胞外酯酶粗酶活性的影响及 pH 稳定性

Fig.6　Effects of pH on extracellular esterase crude enzymes activity and pH stability of strain X8P

批注 [W4]: 横坐标 pH
纵坐标 相对活性 Relative activity/%

2.3.2　菌株 X8P 胞外酯酶粗酶适宜温度和温度稳定性

由图 7 可知，菌株酶活性在 45 ℃时最高，动物体温下酶活性约为适宜温度的 80%，具有较好的温度适应性，在 30～65 ℃有较高活性（50%以上），超过 65 ℃时，酶活性急剧下降（残余活性 10%左右）。在 20～45 ℃处理 30 min，酶活性保留 50%以上。

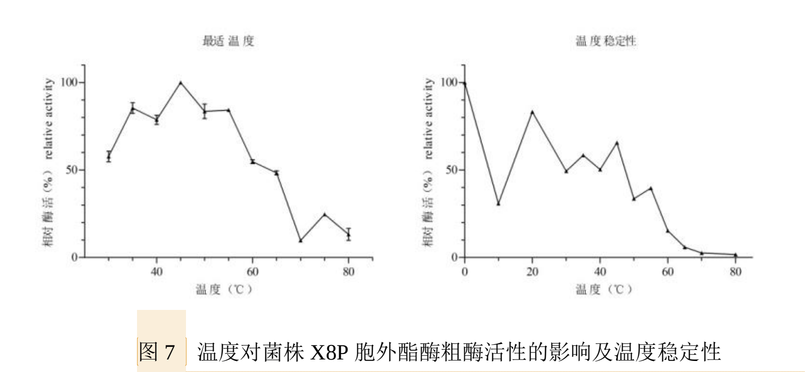


图 7　温度对菌株 X8P 胞外酯酶粗酶活性的影响及温度稳定性

Fig.7　Effects of temperature on extracellular esterase crude enzymes activity and thermal stability of strain X8P

批注 [W5]: 横坐标 温度 Temperature/℃
纵坐标 相对活性 Relative activity/%
下图纵坐标同

2.3.3　有机试剂对菌株 X8P 胞外酯酶粗酶活性影响

由图 8 可知，菌株 X8P 粗酶仅在甘油（50%和 80%）中保留全部活性，在二甲基亚砜

（DMSO）（50%）中活性可保留 66%，在其他有机溶剂中，活性均丧失。

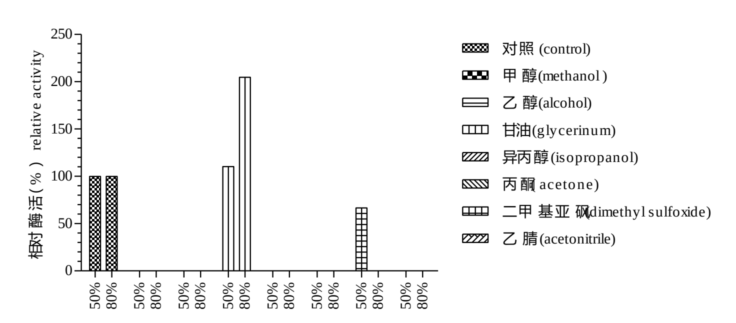


图 8　有机溶剂对菌株 X8P 胞外酯酶粗酶活性的影响

Fig.8　Effects of organic solvents on extracellular esterase crude enzymes activity of strain X8P

2.3.4　表面活性剂对菌株 X8P 胞外酯酶粗酶酶活性影响

由图 9 可知，SDS 强烈抑制菌株酶活性，浓度越高，抑制作用越明显。Tween-20（1 mmol/L）和 Tween-80（1 mmol/L）使菌株酶活促进 2%~3%，而 Tween-20（10 mmol/L）和 Tween-80（10 mmol/L）抑制酶活性。Triton-100（1 和 10 mmol/L）使酶活性提高 30%~35%。

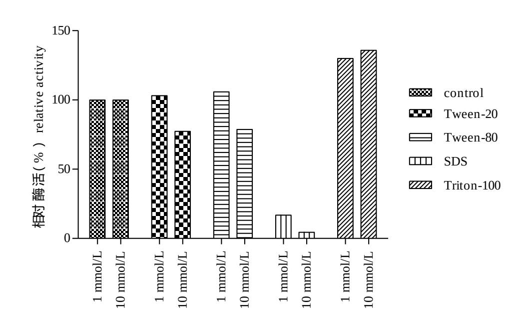


图 9　表面活性剂对菌株 X8P 胞外酯酶粗酶活性的影响

Fig.9　Effects of surfactants on extracellular esterase crude enzymes activity of strain X8P

2.3.5　金属离子对菌株 X8P 胞外酯酶粗酶活性的影响

由图 10 可知，K^{+}、Mn^{2+}（1 和 10 mmol/L）使菌株酶活性提高 2%～20%，Fe^{2+}和 Ni^{2+}对酶活性影响不大。Zn^{2+}明显抑制酶活性。Mg^{2+}、Ca^{2+}、Ba^{2+}、Na^{+}、Fe^{3+}、Cu^{2+}（1 mmol/L）使酶活性提高 10%～20%，Mg^{2+}、Ca^{2+}、Ba^{2+}、Na^{+}、Fe^{3+}、Cu^{2+}（10 mmol/L）对酶活性有抑制作用。

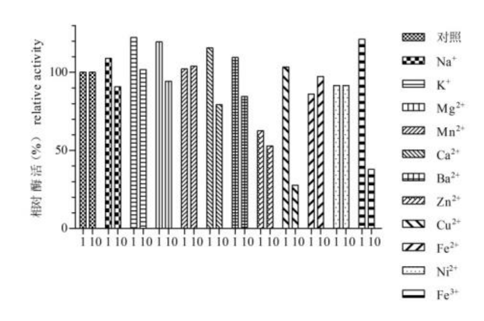


图 10　金属离子对菌株 X8P 胞外酯酶粗酶活性的影响

Fig.10　Effects of metal ions on extracellular esterase crude enzymes activity of strain X8P

3　讨　论

目前，已知植物角质降解菌来源有真菌、放线菌和细菌。角质降解真菌研究最为广泛，而角质降解细菌了解不多。本实验室筛选获得 1 株细菌，经鉴定命名为 *Acetobacter orientalis* X8P，目前尚无关于醋酸杆菌产角质降解酶的报道。

角质降解菌所产角质酶为高度诱导酶[11]，其产酶量受发酵条件和培养基成分影响较大[5,12]。在本试验中发现，菌株 X8P 在 37 ℃发酵 4 d，酶活性达到最高，这与前人研究结果[5,12-13]一致。Yang 等[13]研究发现，太瑞斯梭孢壳（*Thielavia terrestris*）CAU709 适宜产酶温度 50 ℃。Fett 等[5]研究的铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa* ）1499A 和 DAR41352 发酵 24～48 h 达到最大活性。这与本试验结果不同，可能是菌株差异所致。油脂常被用作发酵产酯酶的碳源[14-15]。橄榄油作为碳源可强烈诱导菌株 X8P 产酶，其酯酶活性增加 11 倍左右。可溶性淀粉抑制菌株 X8P 产酶，这与之前报道结果[16]一致。葡萄糖促进菌株 X8P 产酶，这与以往

多数报道结果[11,15-16]不同。Sebastian 等[17]发现，在发酵过程中补充添加葡萄糖不会抑制谷氨酸棒杆菌（*Corynebacterium* sp）产角质酶，说明葡萄糖是否抑制菌株产酯酶仍需探讨。此外，角质水解产物可诱导菌株 X8P 产酶，这与真菌类似[11,17-18]。添加无机氮和有机氮均对菌株 X8P 产酶有明显抑制作用。Kleeberg 等[16]发现，矿物质培养基中添加蛋白胨时，嗜热放线菌（*Thermobifida fusca*）DSM 43793 生物量增加，但聚酯膜降解酶未增加。所以添加无机氮和有机氮抑制菌株 X8P 产酶的可能原因是 LB 培养基中氮源物质已可满足菌株 X8P 发酵产酶，额外添加的氮源使菌株 X8P 持续生长传代，使同时期时处于产酶阶段微生物量减少，从而导致酶产量降低。

酶蛋白适宜 pH 和 pH 稳定性是其重要性质之一。目前，文献报道的大部分角质酶适宜 pH 均在 6.0～10.0 内[7,18-20]。本研究发现，菌株 X8P 胞外粗酶适宜 pH 6.5，这与来源于 *Thermobifida fusca* 和花粉角质酶适宜 pH 一致[16-17]，在 pH 4.5～8.5 之间，菌株 X8P 酶活性可保留 50%以上。此外，菌株 X8P 胞外粗酶在 pH 6.5～7.5 内 30 min，酶活性可保留 60%以上。菌株 X8P 胞外粗酶适宜温度 45 ℃，与已知角质酶适宜温度一致[7,19-20]，在 30～60 ℃均有较高活性（50%以上），在 0~50 ℃处理 30 min，酶活性保留 60%以上。不同来源角质酶温度稳定性存在一定差异。Fett 等[11]发现通高温放线菌（*Thermoactinomyces vulgaris*）NRRL B-16117 角质酶在 50～60 ℃条件下 1 h，酶活性几乎不变，在 70 ℃半衰期 30 min，而真菌 *Fusarium solani pisi* 角质酶在 40 ℃条件下 85 h、60 ℃条件 5 min，活性丧失 50%[20]。这说明角质酶的温度稳定性与菌种来源存在较大关系。

本试验中，菌株 X8P 粗酶在甘油（50%和 80%）中可保留全部活性，在 DMSO（50%）中活性保留 66%，在其他有机溶剂中，活性全部丧失，这与已有文献报道结果[15,21]一致。SDS 强烈抑制菌株 X8P 粗酶活性，这与已有文献报道结果[21-22]一致。酶蛋白活性易受金属离子影响。本研究发现，K^{+}、Mn^{2+}（1 和 10 mmol/L）使菌株 X8P 粗酶活性提高 2%～20%，Fe^{2+}和 Ni^{2+}对粗酶活性影响不大。Zn^{2+}明显抑制粗酶活性。Mg^{2+}、Ca^{2+}、Ba^{2+}、Na^{+}、Fe^{3+}、

Cu^{2+}（1 mmol/L）使粗酶活性提高 10%～20%，Mg^{2+}、Ca^{2+}、Ba^{2+}、Na^{+}、Fe^{3+}、Cu^{2+}（10 mmol/L）对粗酶活性有抑制作用。Sebastian 等[23]研究表明，Ca^{2+}、Mg^{2+}和 Cu^{2+}等金属离子及螯合物不会影响细菌和真菌角质酶的活性，而会影响花粉角质酶的活性[17]。

4　结　论

① 角质降解菌 X8P 经鉴定为 *Acetobacter orientalis* X8P，其适宜发酵条件为 37 ℃、发酵 4 d，1%橄榄油强烈促进菌株 X8P 产酶，1%可溶性淀粉抑制菌株 X8P 产酶。

② 菌株胞外粗酶适宜温度 45 ℃，适宜 pH 6.5，且具有一定的 pH 稳定性，在甘油（50%和 80%）中可保留全部活性，而在 DMSO（50%）中活性可保留 66%，Triton-100、K^{+}、Mn^{2+}（1 和 10 mmol/L）及 Mg^{2+}、Ca^{2+}、Ba^{2+}、Na^{+}、Fe^{3+}、Cu^{2+}（1 mmol/L）对菌株 X8P 粗酶活性有部分促进作用。

参考文献:

[1] LIN T S,KOLATTUKUDY P E.Isolation and characterization of a cuticular polyester (cutin) hydrolyzing enzyme from *Phytopathogenic fungi*[J].Physiological Plant Pathology,1980,17(1):1–15.

[2] KOLATTUKUDY P E.Biopolyester membranes of plants:cutin and suberin[J].Science,1980,208(4447):990–1000.

[3] DEGANI O,GEPSTEIN S,DOSORETZ C G.Potential use of cutinase in enzymatic scouring of cotton fiber cuticle[J].Applied Biochemistry and Biotechnology,2002,102/103(1/2/3/4/5/6):277–289.

[4] INGLIS G D,YANKE L J,SELINGER L B.Cutinolytic esterase activity of bacteria isolated from mixed-plant compost and characterization of a cutinase gene from *Pseudomonas pseudoalcaligenes*[J].Canadian Journal of Microbiology,2011,57(11):902–913.

[5] FETT W F,GERARD H C,MOREAU R A,et al.Screening of nonfilamentous bacteria for

production of cutin-degrading enzymes[J].Applied and Environmental Microbiology,1992,58(7):2123 -2130.

[6] 张效宁,冉琴琴,张学俊.角质酶的研究与应用进展[J].中国酿造,2013,32(11):11–17.

[7] KOSCHORRECK K,LIU D,KAZENWADEL C,et al.Heterologous expression,characterization and site-directed mutagenesis of cutinase CUTAB1 from *Alternaria brassicicola*[J].Applied Microbiology and Biotechnology,2010,87(3):991–997.

[8] FETT W F,GÉRARD H C,MOREAU R A,et al.Cutinase production by *Streptomyces spp*[J].Current Microbiology,1992,25(3):165–171.

[9] NYYSSÖLÄ A,PIHLAJANIEMI V,HÄKKINEN M,et al.Cloning and characterization of a novel acidic cutinase from *Sirococcus conigenus*[J].Applied Microbiology and Biotechnology,2014,98(8):3639–3650.

[10] 刘春红,冯志彪.以α-乙酸萘酯为底物植物酯酶活力测定条件的优化[J].食品工业科技,2008(6):145–147,151.

[11] FETT W F,WIJEY C,MOREAU R A,et al.Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria[J].Letters in Applied Microbiology,2000,31(1):25–29.

[12] KLEEBERG I,HETZ C,KROPPENSTEDT R M,et al.Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters by *Thermomonospora fusca* and other thermophilic compost isolates[J].Applied and Environmental Microbiology,1998,64(5):1731–1735.

[13] YANG S Q,XU H B,YAN Q J,et al.A low molecular mass cutinase of *Thielavia terrestris* efficiently hydrolyzes poly(esters)[J].Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,2013,40(2):217–226.

[14] SHARMA R,CHISTI Y,BANERJEE U C.Production,purification,characterization,and applications of lipases[J].Biotechnology Advances,2001,19(8):–662.

[15] CASTRO-OCHOA D,PEÑA-MONTE C,GONZÁLEZ-CANTO A,et al.Ancut2,an extracellular cutinase from *Aspergillus nidulans* induced by olive oil[J].Applied Biochemistry and Biotechnology,2012,166(5):1275–1290.

[16] KLEEBERG I,WELZEL K,VANDENHEUVEL J,et al.Characterization of a new extracellular hydrolase from *Thermobifida fusca* degrading aliphatic-aromatic copolyesters[J].Biomacromolecules,2005,6(1):262–270.

[17] SEBASTIAN J,CHANDRA A K,KOLATTUKUDY P E.Discovery of a cutinase-producing *Pseudomonas* sp. cohabiting with an apparently nitrogen-fixing *Corynebacterium* sp. in the phyllosphere[J].Journal of Bacteriology,1987,169(1):131–136.

[18] FETT W F,WIJEY C,MOREAU R A,et al.Production of cutinase by *Thermomonospora fusca* ATCC 27730[J].Journal of Applied Microbiology,1999,86(4):561–568.

[19] KWON M A,KIM H S,YANG T H,et al.High-level expression and characterization of *Fusarium solani* cutinase in *Pichia pastoris*[J].Protein Expression and Purification,2009,68(1):104–109.

[20] CHENG S,TONG X,WOODARD R W,et al.Identification and characterization of bacterial cutinase[J].The Journal of Biological Chemistry,2008,283(38):25854–25862.

[21] OUYANG L M,LIU J Y,QIAO M,et al.Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases[J].Applied Biochemistry and Microbiology,2006,169(1) :15–28.

[22] PARK Y,CHOI S,LEE H.A carboxylesterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1;purification,characterization,and expression[J].Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects,2006,1760(5):820–828.

[23] SEBASTIAN J,KOLATTUKUDY P E.Purification and characterization of cutinase from a

fluorescent *Pseudomonas putida* bacterial strain isolated from phyllosphere[J].Archives of Biochemistry and Biophysics,1988,263(1):77–85.

Identification, Fermentation Conditions Optimization and Enzymatic Properties of Cutin Degrading Bacteria

LIANG Zhengwen[1] ZHANG Tieying[1*] LI Shuang[1] LIU Junli[2]

(1. *State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing* 100193, *China*; 2. *College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou* 730070, *China*)

Abstract: The present study was designed to identify the cutin degrading strain X8P, their fermentation conditions and enzymatic properties were also explored, to investigate the degradation of plant cuticular surface, and to improve the possible new schemes for the utilization of plant fiber. The strain X8P was identified by morphology observation and 16S rDNA sequencing, and the optimal fermentation conditions of carbon source, nitrogen source, fermentation temperature and fermentation time for enzyme production were investigated. After precipitating crude extracellular enzyme protein by ammonium sulfate, we studied the optimum pH and pH stability and temperature and temperature stability of crude extracellular enzyme, and the effect of organic solvents, surfactants and metal ions on crude enzyme. The results showed as follows: 1) the strain X8P was successfully identified as *Acetobacter orientalis* by colony morphological characteristic observing and 16S rDNA sequencing. 2) The optimal fermentation conditions of the strain X8P were temperature 37 ℃ and fermentation time for 4 days in the lysogeny broth（LB）medium. The LB medium supplemented with 1% olive oil and glucose was significantly promoted enzyme production, and supplemented with 1% soluble starch inhibited the enzyme production. 3) The optimum temperature and pH of the strain X8P’s extracellular esterase with good pH stability were 45 ℃ and pH 6.5. In tested organic solvents, the enzyme exhibited part of cutinolytic esterase activity only in dimethyl sulfoxide （DMSO）(50%). Tween-20 (1 mmol/L), Tween-80 (1 mmol/L) and Triton-100 (1 and 10 mmol/L) could improve the extracellular enzyme activity as 3% to 35%. Metal ions such as K^+, Mn^{2+} (1 and 10 mmol/L) could improve extracellular enzyme activity as 2% to 20%. Therefore, the strain X8P has certain enzyme potential and application prospects, worthy of further study.

Key words: cutin; cutinase; cutin degrading bacteria; fermentation conditions optimization; enzymatic properties

*Corresponding author, associate professor, E-mail: zhty999@.com （责任编辑 武海龙）